

AGRONOMSKI GLASNIK 5-6/2016.
ISSN 0002-1954

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

RAST I PRINOS GRAŠKA (*PISUM SATIVUM* L.) POD UTJECAJEM BAKTERIZACIJE I GNOJIDBE DUŠIKOM

THE GROWTH AND YIELD OF PEAS (*PISUM SATIVUM* L.) UNDER THE INFLUENCE OF INOCULATION AND NITROGEN FERTILIZATION

**Gabriella Kanižai Šarić, Zlata Milaković, Irena Rapčan,
Ivana Majić, J. Šeput, D. Kojić**

SAŽETAK

Predsjetvenom bakterizacijom sjemena graška u tlo se unosi selekcionirana, visokoučinkovita populacija kvržičnih bakterija pri čemu se nastoji iskoristiti što veći potencijal simbiotske fiksacije dušika u cilju ostvarivanja što većih prinosa. Bakterizacija je osim toga i okolišno prihvatljiv ali i ekonomski opravdan postupak u uzgoju graška i drugih leguminoza. S ciljem utvrđivanja djelotvornosti bakterizacije provedeno je istraživanje o utjecaju vrsta *Rhizobium pisi* i *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* na dva kultivara graška uz tri razine gnojidbe mineralnim dušikom dok su praćeni parametri uključivali ostvarenu biomasu, nodulaciju i prinos. Bakterizacijom s *R. leguminosarum* sv. *viciae* ostvaren je najveći broj i suha masa kvržica na kultivaru Alicia dok je kultivar Čudo Amerike u nodulaciji kompatibilniji s *R. pisi*. Najveći prinos zrna graška ostvaren je bakterizacijom sjemena graška s *R. leguminosarum* sv. *viciae* na oba ispitana kultivara uz primjenu 30 - 60 kg N ha⁻¹. Rezultati istraživanja ukazuju i na potrebu korištenja više djelotvornih ali kompatibilnih *Rhizobium* vrsta i sojeva u sredstvima za bakterizaciju graška kako bi se povećale prednosti koje ova zajednica donosi.

Ključne riječi: grašak, *Rhizobium pisi*, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, prinos

ABSTRACT

With inoculation of peas seed selected, highly effective rhizobia populations are introduced in to the soil to harness the potential of symbiotic nitrogen fixation in order to achieve the highest possible yields. Inoculation is

environmentally friendly and economically a justified process in the cultivation of peas and other legumes. Research study was carried out in order to determine the effectiveness of inoculation with *Rhizobium pisi* and *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* in two varieties of peas with three levels of mineral nitrogen fertilization, while the monitored parameters included realized biomass, nodulation and yield. The highest number and dry weight of nodules was recorded on the cultivar Alicia by inoculation with *R. leguminosarum* sv. *viciae*, while cultivar American Wonder in nodulation was compatible with *R. pisi*. The highest yields of a peas were achieved with seed inoculation with *R. leguminosarum* sv. *viciae* on both tested cultivars together with the use of 30 to 60 kg N ha⁻¹. The research results also indicate the need to use several effective but compatible *Rhizobium* species and strains in the inoculation of peas with the aim of maximizing the benefits of this community.

Key words: peas, *Rhizobium pisi*, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, yield

UVOD

Površine pod graškom u R. Hrvatskoj u zadnjih pet godina (2009. – 2013.) variraju i kreću se od 3528 ha (2012. godina) do 6 060 ha (2011. godina) s prosječnim prinosom od 2,9 t ha⁻¹ (2010. godine) do 5,4 t ha⁻¹ (2011. godine) (Statistički ljetopis, 2014.). Grašak se odlikuje visokom prehrambenom vrijednošću s uravnoteženim odnosom bjelancevina i ugljikohidrata, a mlado zrno obiluje vitaminima, mineralima i bogato je sirovim vlaknima (Matotan, 2004; Lešić i sur., 2002.). Grašak uspijeva na različitim tipovima tala, a zbog kratke vegetacije može se uzgojiti u različitim klimatskim područjima (Lešić i sur., 2002.). Zahvaljujući simbiotskom odnosu koji grašak ostvaruje s kvržičnim bakterijama, ova kultura ima mogućnost namiriti veliki dio svojih zahtjeva spram dušika asimilirajući ga iz zraka. Herridge i sur. (2008.) su procijenili da se globalno u poljoprivrednim sistemima na godišnjoj razini fiksira 21 Mt dušika, koji se osigurava preko simbiotskog odnosa usjeva leguminoza i rizobijum bakterija i 12-25 Mt dušika kroz simbiozu krmnih mahunarki i rizobijuma. Grašak može fiksirati prosječno od 80,5 kg dušika po hektaru (16 do 177 kg N ha⁻¹), a u ovisnosti stvorenoj biomasi, količini mineralnog dušika u tlu i datumu sjetve (Evans i sur., 1989.). Prema istraživanjima Carranca i sur. (1999) godišnja stopa fiksacije dušika kod nebakteriziranog graška varira i kreće se od 31 do 107 kg N ha⁻¹ u uvjetima redovitih oborina i 4 do 37 kg N ha⁻¹

u uvjetima suše. Bakterizacijom sjemena graška, u istome istraživanju, povećava se količina fiksiranog atmosferskog dušika za 50% u odnosu na nebakterizirano sjeme. S obzirom da je u tlu često prisutna autohtona rizobna populacija koja se smatra slabije učinkovitom ili u potpunosti neučinkovitom, poboljšanje rizobne djelotvornosti može se postići selekcijom superiornih sojeva s dokazanom sposobnošću fiksacije dušika, a koje su specifične za određene kultivare graška (Yahui He i sur., 2011.). Cilj ovoga rada je bio utvrditi djelotvornost bakterizacije i gnojidbe dušikom na ostvarenu nadzemnu i podzemnu biomasu, nodulaciju i prinos dva kultivara graška.

MATERIJAL I METODE

Tijekom vegetacijske 2013. godine na lokalitetu Drenovci (Vukovarsko-srijemska županija) postavljen je trofaktorijalni poljski pokus po slučajnom blok planu u tri ponavljanja na površini osnovne parcelice od 6 m². Gnojidba je izvršena predstjetveno sa 70 kg ha⁻¹ fosfora i 100 kg ha⁻¹ kalija i 0, 30 i 60 kg dušika ha⁻¹. Sjetva dva kultivara graška: Alicia (GSN Semences, Francuska) i Čudo Amerike (Green Garden, Italija) obavljena je ručno na međuredni razmak od 20 cm uz sjetvenu normu od 0,04 kg m². Izolati *Rhizobium pisi* DSM 30132 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellenkulturen GmbH, Njemačka) i *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* OS-103 (izoliran s područja Osječko-baranjske županije) umnoženi su u tekućoj kvasac - manitol podlozi u količini od 10x10⁹ CFU, a potom nanešeni na sterilni treset. Bakterizacija sjemena graška izvršena je neposredno pred sjetvu. U punoj fazi cvatnje izvršeno je uzorkovanje po 5 biljaka sa svake parcele, a potom je utvrđen broj i masa suhe tvari kvržica po biljci, te suha masa nadzemnog i podzemnog dijela biljke. Na kraju vegetacije utvrđen je i prinos zrna graška. Analiza klimatskih pokazatelja obavljena je uz pomoć podataka Državnog hidrometeorološkog zavoda, meteorološka postaja Gradište. Statistička analiza rađena je s Microsoft Excel (2013) i Statistika 12 (StatSoft, 2013) pri čemu je korištena faktorijalna analiza varijance i Fisher-ov LSD test.

REZULTATI I RASPRAVA

Najveće odstupanje srednje mjesečne temperature zraka uočena je u travnju 2013. godine, kada je zabilježena temperatura od 14 °C, za 1,7 °C veća od višegodišnjeg prosjeka (Tablica 1). Ukupna količina oborina u periodu od

travnja do svibnja 2013. godine iznosi 305,3 mm dok je višegodišnji prosjek 308,7 mm. Raspored oborina u 2013. godini se razlikuje od višegodišnjeg prosjeka, a karakterizira ga manjak oborina u travnju i lipnju (24 mm i 48,1 mm manje u odnosu na višegodišnji prosjek), višak oborina u svibnju (66,6 mm više u odnosu na prosjek) dok su oborine za mjesec srpanj u skladu s višegodišnjim prosjekom.

Tablica 1. Srednja mjesečna temperatura zraka i oborine u 2013. godini i višegodišnji prosjek (1981. - 2010.) za period travanj-srpanj na meteorološkoj postaji Gradište

Table 1 The monthly average of air temperatures and precipitation in 2013 and the multiannual average in the period 1981 – 2010 for the vegetation months at weather station in Gradište

Mjesec	Srednja mjesečna temperatura zraka, °C		Oborine, mm	
	2013.	1981.-2010.	2013.	1981.-2010.
Travanj	14,0	12,3	37,6	61,6
Svibanj	17,1	17,6	139,1	72,5
Lipanj	20,8	20,5	63,1	111,2
Srpanj	23,4	22,6	65,5	63,4

Bakterizacijom sjemena graška kultivara Alicia s *R. leguminosarum* sv. *viciae* ostvaren je veći broj i veća masa suhe tvari kvržica u usporedbi s *R. pisi* ($P < 0,05$) (Tablice 2 i 3). Suprotan slučaj zabilježen je na kultivaru Čudo Amerike koji je kompatibilniji s *R. pisi* ($P < 0,05$) u ovim ispitanim parametrima. Ovakav rezultat potvrđuje već poznatu činjenicu o važnosti selekcije učinkovitih sojeva te pronalaženje najkvalitetnije simbiozne zajednice sorta x soj (Sikora i Redžepović, 2000; Sikora i sur., 2008.). Najveći broj kvržica po biljci na kultivaru Alicia utvrđen je u kontrolnom (nebakteriziranom) tretmanu, što pretpostavlja činjenicu o prisutnosti visokoučinkovitih nativnih sojeva kvržičnih bakterija u tlu a koje su omogućile prve interakcije i rezultirale formiranjem kvržica. Slična zapažanja zabilježili su i Kelstrup i sur. (1996.) koji su prilikom istraživanja količine fiksiranog dušika autohtone rizobne populacije i komercijalnih preparata zaključili da sojevi prisutni u preparatima za bakterizaciju nisu dovoljno dugo preživjeli u tlu ili nisu bili dovoljno konkurentni u odnosu na autohtonu populaciju. U istome istraživanju bakterizacija nije imala učinak na količinu fiksiranog dušika, rast biljke, sadržaj dušika u biljci i prinos zrna graška i lupine. U rezultatima ovoga istraživanja

uočljivo je i smanjenje broja i suhe mase kvržica po biljci povećanjem gnojidbe dušikom u odnosu na kontrolu. Inhibitoran utjecaj mineralnog dušika na formiranje kvržica i aktivnost nitrogenaze zabilježili su i mnogobrojni istraživači biološke fiksacije leguminoza kod nas i u svijetu (Sprent i sur., 1988.; Redžepović i sur., 1991.; Voisin i sur., 2002.; Achakzai, 2007.).

Tablica 2. Utjecaj tretmana na broj kvržica po biljci graška

Table 2 The impact of treatment on nodule number per plant of peas

	Broj kvržica po biljci					
	Alicia			Čudo Amerike		
	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>
0 kg N ha ⁻¹	29,2 a	9,0 d	16,2 f	4,9 i	10,7 e	4,9 i
30 kg N ha ⁻¹	17,2 b	11,0 e	13,5 g	2,5 j	5,7 hi	5,9 h
60 kg N ha ⁻¹	21,0 c	11,5 e	6,2 h	1,7 jk	4,5 i	1,2 k

R0: bez bakterizacije, *R.*: *Rhizobium*, vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0,05) prema Fisherovom LSD testu.

R0: without bacterization, *R.*: *Rhizobium*, values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) according to Fisher LSD test.

Tablica 3. Utjecaj tretmana na masu suhe tvari kvržica po biljci graška

Table 3 The impact of treatment on nodule dry weight per plant of peas

	Masa suhe tvari kvržica po biljci (g)					
	Alicia			Čudo Amerike		
	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>
0 kg N ha ⁻¹	0,0213 a	0,0113 bd	0,0167 acd	0,0053 cdeij	0,0173 acdm	0,0040 eio
30 kg N ha ⁻¹	0,0153 ab	0,0100 be	0,0187 ah	0,0047 bik	0,0127 bfgmhn	0,0080 cdein
60 kg N ha ⁻¹	0,0113 bcgjm	0,0087 cdefk	0,0093 bfi	0,0027 fjklo	0,0060 cdeil	0,0003 ie

R0: bez bakterizacije, *R.*: *Rhizobium*, vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0,05) prema Fisherovom LSD testu

R0: without bacterization, *R.*: *Rhizobium*, values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) according to Fisher LSD test.

Najveća suha masa stabljike i suha masa korijena ostvarena je bakterizacijom s *R. leguminosarum* sv. *viciae* na kultivaru Alicia (Tablice 4. i 5). Isti parametri na kultivaru Čudo Amerike postigli su najveću težinu uz bakterizaciju s *R. pisi* i 60 kg N ha⁻¹. Povećanjem gnojidbe dušikom povećava se i suha masa stabljike. Rezultati pokazuju smanjenje suhe mase korijena na oba ispitana kultivara gnojidbom sa 60 kg N ha⁻¹ u nebakteriziranom i tretmanu s *R. leguminosarum* sv. *viciae*. Istraživanja Voisina i sur. (2002.) također su utvrdila kako prisutnost mineralnog dušika u tlu stimulira vegetativni rast i rast korijena graška, što rezultira većom akumulacijom nadzemne i podzemne biomase. Biljke koje se oslanjaju isključivo na dušik iz simbiotske fiksacije imaju manju biomasu korijena ali veću biomasu kvržica u usporedbi s biljkama koje se opskrbljuju mineralnim nitratima (Voisin i sur. 2003.).

Tablica 4. Utjecaj tretmana na suhu masu stabljike graška

Table 4 The impact of treatment on shoot dry weight of peas

	Suha masa stabljike po biljci (g)					
	Alicia			Čudo Amerike		
	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>
0 kg N ha ⁻¹	0,7257 a	1,0460 d	0,5637 g	0,4957 j	0,3557 m	0,4717 p
30 kg N ha ⁻¹	1,1107 b	0,9123 e	1,0250 h	0,8340 k	0,6697 n	0,3577 m
60 kg N ha ⁻¹	1,1137 c	0,9177 f	1,2540 i	0,6037 l	1,0057 o	0,6880 r

R0: bez bakterizacije, R.: *Rhizobium*, vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0,05) prema Fisherovom LSD testu.

R0: without bacterization, R.: *Rhizobium*, values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) according to Fisher LSD test.

Tablica 5. Utjecaj tretmana na suhu masu korijena graška

Table 5 The impact of treatment on root dry weight of peas

	Suha masa korijena po biljci (g)					
	Alicia			Čudo Amerike		
	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>
0 kg N ha ⁻¹	0,3543 a	0,1543 d	0,0727 f	0,0970 h	0,0737 f	0,0767 f
30 kg N ha ⁻¹	0,4277 b	0,2557 e	0,1667 g	0,1037 hi	0,0460 j	0,0757 f
60 kg N ha ⁻¹	0,1273 c	0,2500 e	0,1227 c	0,0700 f	0,1060 i	0,0697 f

R0: bez bakterizacije, R.: *Rhizobium*, vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0,05) prema Fisherovom LSD testu.

R0: without bacterization, R.: *Rhizobium*, values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) according to Fisher LSD test.

Tablica 6. Utjecaj tretmana na prinos graška

Table 6 The impact of treatment on yield of peas

	Prinos (kg ha ⁻¹)					
	Alicia			Čudo Amerike		
	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>	R0	<i>R. pisi</i>	<i>R. leguminosarum</i>
0 kg N ha ⁻¹	1921,7 a	2005,3 c	1605,0 f	1328,7 h	2224,7 e	1116,7 j
30 kg N ha ⁻¹	1855,7 b	1688,7 d	2317,7 g	1734,0 di	1100,0 j	2873,0 k
60 kg N ha ⁻¹	1996,3 c	2182,3 e	1579,3 f	1717,3 d	1787,3 i	2984,0 l

R0: bez bakterizacije, R.: *Rhizobium*, vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0,05) prema Fisherovom LSD testu.

R0: without bacterization, R.: *Rhizobium*, values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05) according to Fisher LSD test.

Bakterizacijom graška uz gnojidbu mineralnim dušikom u ovome istraživanju ostvareni su najbolji prinosi, međutim uočljiv je značajan utjecaj visokoučinkovite nativne populacije u tlu koja je djelovala na ostvarenje značajnih prinosa i relativno visokih vrijednosti ostalih ispitanih parametara u kontrolnom tretmanu. Poželjna su, stoga, istraživanja kojima bi se izolirala i determinirala ova skupina mikroorganizama tla. Također rezultati ukazuju na potrebu korištenja više djelotvornih ali kompatibilnih *Rhizobium* vrsta i sojeva u sredstvima za bakterizaciju graška, kako bi se maksimalno iskoristio potencijal simbiozne zajednice leguminoza i kvržičnih bakterija.

ZAKLJUČAK

Najbolja nodulacija te podzemna i nadzemna masa ostvareni su bakterizacijom sjemena graška kultivara Alicia s *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*. Isti su parametri na kultivaru Čudo Amerike postigli najveće vrijednosti uz bakterizaciju s *Rhizobium pisi*. Najveći prinosi graška utvrđeni su u tretmanu bakterizacije s *R. leguminosarum* sv. *viciae* i gnojdbom s 30-60 kg N ha⁻¹ na oba ispitivana kultivara graška. Rezultati ukazuju na potrebu korištenja više djelotvornih ali kompatibilnih *Rhizobium* vrsta i sojeva u komercijalnim sredstvima za bakterizaciju graška s ciljem maksimalnog iskorištavanja potencijala simbiozne fiksacije dušika. Poželjna su i daljnja istraživanja koja bi trebala utvrditi optimalne odnose u odabiru kultivara graška i rizobium soja. Također, neophodna je izolacija i identifikacija nativne rizobne populacije tla koja se pokazala vrlo djelotvornom u odnosu na ispitane parametre ovoga istraživanja.

LITERATURA

1. Achakzai, A.K.K. (2007.): Effect of various levels of nitrogen fertilizer on nodulation of pea cultivars. *Pakistan Journal of Botany* 39 (5): 1673-1680.
2. Carranca, C., de Varennes, A., Rolston, D. (1999.): Biological nitrogen fixation by fababean, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. *European Journal of Agronomy* 10: 49–56.
3. Erman, M., Ari, E., Togay, Y., Çig, F. (2009.): Respons of field pea (*Pisum sativum* sp. *Arvense* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen application in eastern Anotolia: *Journal Of Animal and Veterinary Advances* 8: 612-616.
4. Evans, J., O'Connor, G.E., Turner, G.L., Coventry, D.R., Fettel, N., Mahoney, J., Armstrong, E.L. Walsgott, D.N. (1989.): N_2 Fixation and its value to soil N increase in lupin, field pea and other legumes in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 40: 791-805
5. Kelstrup, L., Rowarth, J.S., Williams, P.H. Ronson, C. (1996.): Nitrogen fixation in peas (*Pisum sativum* L.), lupins (*Lupinus angustifolius* L.) and lentils (*Lens culinaris* Medik.). *Proceedings Agronomy Society of New Zeland* 26:71-74.
6. Yahui He, Lizhuo Guo, Hutian Zhang, Gaobao Huang (2011.): Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming system. *African Journal of Biotechnology* 10 (18): 3540-3548.
7. Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M. (2008.): Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311: 1–18.
8. Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Čuustić, M., Poljak, M, Romić, D. (2002.): Povrćarstvo. Zrinski, Čakovec.
9. Matotan, Z. (2004.): Suvremena proizvodnja povrća, Nakladni zavod Globus, Zagreb.
10. Redžepović, S., Sikora, S., Sertić, Đ., Manitašević, J., Šoškić, M., Klaić, Ž. (1991.): Utjecaj fungicida i gnojidbe mineralnim dušikom na bakterizaciju i prinos soje. *Znan. Prak. Poljop. Tehnol.* 21: 43-49.
11. Sikora, S., Redžepović, S. (2000.): Identification of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains isolated from different soil types in western Slavonia. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 65 (4): 229-236.
12. Sikora, S., Blažinkov, M., Babić, K., Sudarić, A., Redžepović, S. (2008.): Symbiotic nitrogen fixation and sustainable soybean production. *Cereal research communications* 36: 1483-1486.

13. Sprent, J. I., Stephens, J. H., Rupela, O. P. (1988.): Environmental effects on nitrogen fixation. In World Crops: Cool Season Food Legumes. Ed. R J Sumerfield. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
14. Voisin, A-S., Salon, C., Munier-Jolain, N.G., Ney, B. (2002.): Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). Plant and Soil 242: 251–262.
15. Voisin, A-S., Salon, C., Jeudy, C., Warembourg, F.R. (2003.): Root and nodule growth in *Pisum sativum* in relation to photosynthesis: analysis using ¹³C-labeling. Annals of Botany 92: 557-563.
16. Statistički ljetopis Republike Hrvatske, 2014. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb.

Adrese autora – Author's addresses:

izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić,
e-mail: gkanizai@pfos.hr,
prof. dr. sc. Zlata Milaković,
izv. prof. dr.sc. Irena Rapčan,
izv. prof. dr. sc. Ivana Majić,
Jurica Šeput, student
Davor Kojić

Sveučilište J. J. Strossmayera
Poljoprivredni fakultet u Osijeku,
Vladimira Preloga 1
31000 Osijek

Primljeno – Received:

28.10.2016.

